60—65 3194(11)

动物学研究 1993, 14 (1): 60—65 ISSN 0254-5853
Zoological Research CN 53-1040 / Q

虎纹捕鸟蛛毒的生物学活性鉴定*

梁宋平 覃于宾 张东裔 潘欣 陈湘定 谢锦云
(湖南师范大学生物学系 长沙 410006)

Q959.226

摘要 本文报道了采集广西产虎纹捕鸟蛛 (*Selenocosmia huwena*) 毒液的方法，并对粗毒进行了部分生物学活性的测定。该粗毒对小鼠和蜚蠊的 LD_{50} 分别为 1.16 mg / kg 和 300 μg / g。该粗毒具有透明质酸酶、碱性磷酸酶、蛋白水解酶和脱氧核糖核酸酶活性。未测到磷脂酶 A 和胆碱脂酶活性。通过电生理实验发现该粗毒含有阻断蟾蜍神经肌肉接头传递的毒素，并观察到当小鼠接受腹腔注射致死剂量 (5 mg / kg) 粗毒后便迅速出现呼吸麻痹。

关键词: 蜘蛛毒，虎纹捕鸟蛛，神经毒素，透明质酸酶 鉴定

在我国广西宁明，云南勐海一带发现的虎纹捕鸟蛛，最近被鉴定为蜘蛛新种，属于捕鸟蛛科 (Theraphosidae)，定名为 *Selenocosmia huwena* (王家福，1992)。此蜘蛛穴居地下，穴呈圆形，深约 40—100 cm，洞口布以蛛网。雌性体长 6—9 cm，步足长 6—10 cm，重 20—30 g，身体多毛，腹部背面有虎皮状花纹，螯爪长约 1 cm，坚硬锋利，经诱食或刺激后射出毒液。广西宁明县常有家畜被其咬伤的记录。牛在吃草时鼻部被咬伤后，出现烦燥，口渴，衰竭，严重者可致死亡。

对蜘蛛毒的研究、由于采毒较困难，因而不如蛇毒和蝎毒的研究那样广泛深入。国外蛛毒研究较为深入的有漏斗蛛 (*Atrax robustus* 和 *Agelenopsis aperta*) (Skinner 等，1989; Brown 等，1988)、平甲蛛 (*Loxosceles reclusa*) (Jong 等，1979) 和黑寡妇蛛 (*Latrodectus mactans tredecimguttatus*) (Grasso 等，1976) 等。在这些蛛毒中发现有多种酶类以及对哺乳动物，昆虫神经系统有选择性作用的一些神经毒素。我国学者发现新疆穴居狼蛛 (*Lycosa singoriensis*) 粗毒中有对谷氨酸能神经肌肉接头传递有阻遏作用 (徐科等，1986)，还有抑菌多肽以及抑制肺腺癌培养细胞生长的组分 (徐科等，1989; 赵维勤等，1991)。目前对捕鸟蛛科 *Selenocosmia* 属的蜘蛛毒的研究尚未见报道。本文报道虎纹捕鸟蛛毒液的采集以及部分生物学活性的测定结果。

材料和方法

1. 材料 活虎纹捕鸟蛛采于广西宁明县。昆明种小鼠购自湖南医科大学动物房。美洲蜚蠊由北京大学实验东馆提供。透明质酸、磷酸二对硝基苯酯、酪蛋白、牛血清清

* 国家自然科学基金资助项目。
本文 1991 年 12 月 2 日收到，1992 年 5 月 25 日修回。

蛋白为上海东风生化试剂厂出品。小牛胸腺 DNA 为上海奶制品厂出品。卵磷脂为四川大学出品。溴化乙酰胆碱为上海化学试剂三厂出品。比色测定使用日本 U-2000 型紫外可见分光光度计，电生理实验使用 LMS-2B 型二道生理记录仪（成都仪器厂出品）。

2. 捕鸟蛛毒液的采集　将 3—4 根长约 4 cm 内径为 1.5 mm 的透明塑料软管捆成一束作为诱物，用大镊子从侧面夹住蜘蛛胸部，蜘蛛便张开螯爪，这时将软管束诱物送入螯爪下，它即用触肢抱住软管束，将螯爪有力地刺入软管内射出毒液。由于每只蜘蛛的两个螯爪通常并不同时射毒，且每次每个螯爪不一定射出全部毒液，因而上述过程需进行多次。射毒后从螯爪下慢慢抽出软管束，用微量注射器将其中的毒液抽出，毒液经冰冻真空干燥后得到的白色（略带微黄）干粉即为粗毒。

3. LD_{50} 测定　LD_{50}（小鼠）的测定用昆明种小鼠，雌雄不分、每只体重 20 g 左右，分为 5 组，每组 6 只。粗毒用生理盐水溶解，按每公斤体重 1.5、1.24、1.02、0.83 mg 剂量腹腔注射，注射体积为每只小鼠 20 μl，第 5 组注射 20 μl 生理盐水，观察 24 h。LD_{50}（蜚蠊）的测定用美洲蜚蠊，共分 5 组，每组 6 只，粗毒用昆虫生理盐水溶解，按蜚蠊每克体重 150、225、337、500 μg 剂量从第四、五腹板交接处注入腹腔，对照组注射等体积的生理盐水，观察 24 h。LD_{50} 的计算按改良寇氏法公式：

$$LD_{50}=\log^{-1}\left[Xm-i\left(\sum p-0.5\right)\right]$$

式中 X_m 为最大剂量对数值，p 为动物死亡率，$\sum p$ 为各组死亡率的总和，i 为两组剂量比的对数。

4. 蛋白质含量的测定　按 Lowry 法（1951）进行，以牛血清清蛋白为标准。

5. 酶活性测定　透明质酸酶：基本按 Ferrante（1956）比浊法进行。反应总体积 1 ml，其中底物 0.4 ml（1 ml pH5.0 乙酸缓冲液中含透明质酸 500 μg），0.2M pH5.0 乙酸缓冲液（内含 0.15M NaCl）0.55—0.59 ml，37℃预保温 20 min 后加入酶液 10—50 μl，37℃反应 15 min，立即加入 4 ml 内含 2.5%十六烷基溴化三甲基铵的 2%NaOH 液，30 min 后在 400 nm 比浊，以 200 μg 底物形成的浊度被降低 50%所需的酶量为一活性单位。

蛋白水解酶：参照 Rich（1963）的方法，反应总体积 6 ml，其中含 0.5—3.0 mg／ml 蛛毒溶液 1 ml（配在 0.05MTris-HCl 缓冲液中，pH7.6）、2%热变性酪蛋白溶液 5 ml（pH7.6）。在 37℃保温 60 min，加入 5 ml 三氯乙酸终止反应，放置 20 min 后过滤；取滤液 1 ml 加入 0.5N NaOH 2 ml 以及 1：2.3 稀释的 Folin 试剂 0.6 ml，37℃下放置 20 min 后在 660 nm 比色，测定酪氨酸的生成，以每分钟水解产生 1 μg 酪氨酸的酶量为一个活性单位。

碱性磷酸单酯酶：参照 Bessey（1952）的方法进行，以硝基酚磷酸二钠盐为底物。

胆碱脂酶：参照 Pilz（1963）方法测定，以溴化乙酰胆碱为底物。

磷酯酶 A：按 Hurtado（1964）等人的方法进行，采用大白鼠红血球测定溶血率。

脱氧核糖核酸酶：基本按 Kunitz 的方法进行（1964），反应总体积 4.0 ml，其中底物 DNA 溶液 3 ml（4 mgDNA 溶于 50 ml 双蒸水，加入 10 ml 1.0M pH5.0 乙酸缓冲液和 10 ml 0.05 M 硫酸镁溶液），加入蛛毒水溶液（1—3 mg／ml）1 ml，对照管加双蒸水，测量每分钟 260 nm 光吸收的增加值、以 25℃下每分钟使 260 nm 光吸收值增加

0.001 的酶量为 1 单位。

6. 粗毒对蟾蜍坐骨神经缝匠肌标本的作用 剥制蟾蜍坐骨神经缝匠肌标本，将残留的腿骨固定，将缝匠肌肌腱上的结扎线与张力换能器相连，用生理记录仪记录缝匠肌的收缩张力。给以 0.3 V，频率为每秒 3 次的重复电刺激，记录缝匠肌的收缩张力，然后用微量注射器将浓度为 3 mg／ ml 的粗毒生理盐水溶液分别滴加在神经干和肌肉接头部，期间维持同样强度的电刺激，分别记录收受张力的变化。

7. 粗毒对小鼠呼吸与心电图的作用 在麻醉（乙醚）条件下，将小鼠（25 g）四肢用酒精涂擦后夹上电极夹，通过Ⅲ导联记录心电。用小钩勾住小鼠剑突处的皮肤，通过换能器记录膈肌呼吸性节律。从腹腔注射粗毒生理盐水溶液 30 μl（含粗毒 128 μg），记录注射粗毒溶液后动物死亡前的心电和呼吸变化。

结 果 与 讨 论

对蜘蛛毒的研究，已往多数是通过解剖分离毒囊进行匀浆，再用溶剂（水）抽提的方法来得到粗毒，该方法的不足之处是不能定量反应毒液本身的真实情况，且因混有非毒素成分给以后的分离带来一定的麻烦。针对捕鸟蛛个体较大的特点，我们在研究中采用了一种从蜘蛛螯爪尖端直接收集纯净毒液的方法，再通过冰冻干燥制成粗毒。我们研究得出了虎纹捕鸟蛛毒液的主要性质见表 1。

表 1 虎纹捕鸟蛛毒液的部分性质

Tab. 1 Partial properties of spider *Selenocosmia huwena* venom

毒液产率	10—30 μl／只次
鲜毒液重量	1.12 mg／ μl 毒液
干物质重(冻干后)	0.23 mg／ μl 毒液
蛋白质含量	0.774 mg／ mg 粗毒
LD_{50} 小鼠	1.16 mg／kg 体重
LD_{50} 美洲蜚蠊	300 μg／g 体重
透明质酸酶活性	109 U／mg 粗毒
碱性磷酸酶活性	2.26×10^{-3} U／mg 粗毒
蛋白水解酶活性	6.6×10^{-4} U／mg 粗毒
DNA 酶活性	5.58 U／mg 粗毒
磷脂酶 A 活性	0 U／mg 粗毒
胆碱酯酶活性	0 U／mg 粗毒

虎纹捕鸟蛛粗毒对小鼠有较强的毒性，从 LD_{50} 的量来看，其毒性要强于少棘蜈蚣（其 LD_{50} 小鼠为 22.5 mg／kg。汪猷等，1985）和马氏钳蝎（其 LD_{50} 小鼠为

2.6 mg／kg。吉永华等，1988)，但低于国外报道的漏斗蛛的毒性（其 LD_{50} 小鼠为 0.5 mg／kg)。经腹腔以较大剂量注射后，小鼠表现出喘息，蜷伏，动作失调，抽搐等症状后死亡。死亡的小鼠有眼球突出的现象。该粗毒对美洲蜚蠊的毒性比较低，大剂量注射后，蜚蠊出现后肢麻痹，爬行蹒跚，足部抖动，直至死亡。

研究中发现虎纹捕鸟蛛毒液中具有较高的透明质酸酶活性，文献报道中大多数蜘蛛毒含有此酶，它可能有加速毒素向机体组织扩散的作用。

按前述方法测定出虎纹捕鸟蛛毒液中具有 DNA 酶活性后，又用下述实验作了进一步验证：在盛有小牛胸腺 DNA 的试管中分别加入 35、75、150 和 300 μg 的粗毒溶液，在 25℃ 保温 15 min，用琼脂糖电泳鉴定水解结果。加入 150 和 300 μg 粗毒的样品将 DNA 全部水解为小片段，在本实验条件下用溴化乙啶（EB）通过紫外光不能显示出来，而加入 35 μg 蛛毒的样品则能显示出部分 DNA 片段，因而进一步证实了该蛛毒具有 DNA 酶活性。粗毒中没有测到磷脂酶 A 活力，样品浓度增加到 5 mg／ ml 也不能测到溶血活性。测定中以银环蛇毒为对照，测出银环蛇毒半溶血量（HU_{50}）与文献报道的基本一致，因而虎纹捕鸟蛛粗毒中无磷脂酶 A 活力的结果应该是可靠的。同时，也没有发现该蛛毒具有胆碱脂酶活性，以眼镜蛇毒样品验证了测试方法的可靠性。

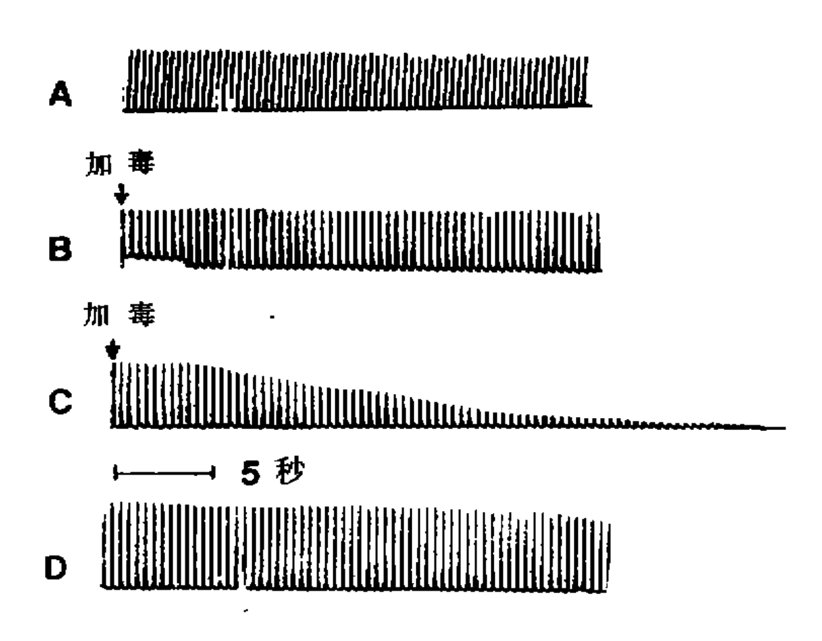


图 1 虎纹捕鸟蛛粗毒对蟾蜍缝匠肌坐骨神经的作用

Fig.1 Effect of *S.huwena* venom on sciatic nerve—sartorius preparation of toad

A. 未施毒前 B. 在神经干施毒后 C. 在神经肌肉接头施毒后由电刺激神经引发的缝匠肌收缩 D 在神经肌肉接头施毒后直接刺激缝匠肌产生的收缩

粗毒对蟾蜍缝匠肌坐骨神经标本的作用结果见图 1。在神经干上滴加 3 mg／ ml 浓度的粗毒溶液，不能阻断神经冲动传导，给刺激后仍能记录到收缩张力，而在神经肌肉接头部滴加粗毒溶液 30 s 后，由刺激神经引起的肌肉收缩活动即被抑制。使用 Ringer 溶液

多次冲洗接头部，未见抑制作用消除，但直接刺激缝匠肌仍可引导出与对照相同的收缩张力记录，上述结果初步说明虎纹捕鸟蛛粗毒的上述抑制作用发生在神经肌肉接头部。

粗毒对小鼠心电和呼吸的作用见图 2。腹腔注射较大剂量的粗毒后 20 s 呼吸即停止，而心电记录却持续了 18 min，其间心律有逐渐减慢的趋势，说明呼吸麻痹是使小鼠致死的首要因素。

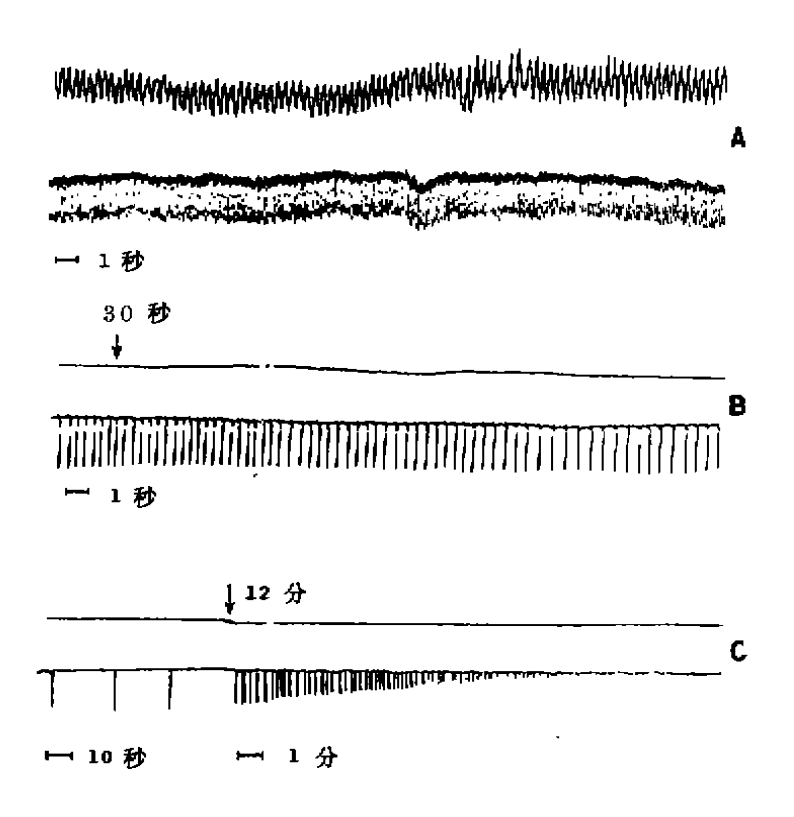


图 2 捕鸟蛛粗毒对小鼠呼吸运动和心电的作用

Fig. 2 Effect of *S.huwena* venom on respiratory movement and ECG of mouse

A. 注射粗毒前 B. 注射后 30 s C. 注射后 12 min 记录的呼吸运动和心电

结论 上述测定表明，虎纹捕鸟蛛粗毒具有较强的哺乳动物毒性和一定的昆虫毒性，并含有透明质酸酶，蛋白水解酶，碱性磷酸酶和 DNA 酶。粗毒中含有阻断神经肌肉接头传递的神经毒素，致死剂量的粗毒可使小鼠迅速产生呼吸麻痹而死亡。

本研究室正在对该蛛毒中的神经毒素和有关酶类进行分离纯化和进一步研究。

致谢 尹长民教授对本研究给予多方面指导；王家福副教授，彭贤锦讲师对蜘蛛的采集和饲养给予了帮助和指导。

参 考 文 献

吉永华等. 1988. 毒素的研究和利用. 陈远聪等主编. 北京：科学出版社，145—158.

汪 猷等. 1985. 蜈蚣粗毒的生物活性. 科学通报，30 (3)：218—222.

赵维勤等. 1991. 穴居狼蛛毒的某些组分对培养的人肺腺癌细胞（SPC-A1）的致伤作用 动物学研究，12 (1)：67—71.

徐 科等. 1986. 穴居狼蛛毒对螯虾兴奋性接头电位的阻遏作用. 两栖爬行动物学报, 5 (4): 278—281.

徐 科等. 1989. 穴居狼蛛 (*Lycosa sigoriensis*) 毒液中的一个抗菌多肽的鉴定和纯化. 动物学报, 35 (3): 300—305.

Bessey, O. A. *et al.* 1952. Preparation and measurement of the purity of the phosphatase reagent disodium p-nitrophenyl phosphate. *J. Biol. Chem.* 196: 175.

Brown, M. R. *et al.* 1988. Amino acid sequence of versutoxin, a lethal neurotoxin from the venom of the funnel-web spider *Atrax versutus*. *Biochem. J.* 250: 401—405.

Ferrante, N D 1956. Turbidimetric measurement of acid mucopalysaccharides and hyaluronedase activity. *J. Biol. Chem.* 220: 303—307.

Gilbo, C. M. and Coles, N. W. 1964. An investigation of certain components of the venom of the female Sydney funnel-web spider, *A. robustus*. *Aust. J. Biol. Sci.* 17: 758—763.

Grasso, A. 1976. Preparation and properties of a neurotoxin purified from the venom of the black widow spider (*Latrodectus mactans tredecimguttatus*). *Biochim. Biophys. Acta* 439: 409—412.

Hurtado, I. *et al.* 1964. A quantitative method for the assay of snake venom hemalytic activity. *Toxicon* 2: 43—47.

Jong, Y. S. *et al.* 1979. Separation and charaterization of venom components in *Loxosceles recalusa*. *Toxicon*, 17: 529—537.

Lawry, D H. *et al.* 1951. Protein measurement with the folin phenol reagent. *J. Biol. Chem.* 193: 265—275.

Pilz, W. 1963. Methods of Enzymatic Analysis 765—770 H. U. Bergmeyer (ed) Academic press, New Youk.

Rich, W. 1963. Methods of Enzymatic Analysis. 800—806 H. U. Bergmeyer (ed) Academic Press, New Youk.

Skinner, W. S. *et al.* 1989. Purification and characterization of two class of neurotoxin from the funnel web spider, *Agelenopsis aperta*. *J Biol. Chem.* 264: 2150—2155.

BIOLOGICAL CHARACTERIZATION OF SPIDER (*Selenocosmia huwena*) CRUDE VENOM

Liang Songping Qin Yubing Zhang Dongyi
Pan Xin Chen Xiangding Xie Jingyun

(*Department of Biology, Hunan Normal University* 410006)

A method of collect venom from the spider (*Selenocosmia huwena*) was reported. The biological activities of the crude venom were analyzed. The LD_{50} of the venom in mice and cockroach were 1.16 mg / kg and 300μg / g respectively. It has enzyme activities of hyaluronidase, alkaline phosphatase, protease. and DNAse, but no choline esterase and phospholipase A were found in it. In the isolated toad sciatic nerve-sartorius preparation the venom at a concentration of 3mg / ml was found to block the neuromuscular transmission irreversibly. In mice, the crude venom in dosage of 5 mg / kg caused respiratory failure in about 20 seconds.

Key words: Spider venom, *Selenocosmia huwena*, Neurotoxin, Hyalutonidase